

## ChIL 遺伝子 DNA 組換クラミドモナスの葉緑体形成過程

### 2. 光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体の動態

長 船 哲 齊\*\*\*\*・塚 本 早 苗\*・小早川ゆり\*\*・江 原 友 子\*\*\*

浜 田 元 輔\*\*・清 原 伸 彦\*\*・大 和 眞\*\*\*\*

(平成 9 年 5 月 2 日受付, 平成 9 年 6 月 16 日受理)

## Formation of Thylakoids in *Chlamydomonas reinhardtii* JS1000 Cells during Greening 2. Immunocytochemical Localization of LHCP II

Tetsuaki OSAFUNE, Sanae TSUKAMOTO, Yuri KOBAYAKAWA, Tomoko EHARA,  
Motosuke HAMADA, Nobuhiko KIYOHARA and Makoto YAMATO

Cells of *Chlamydomonas reinhardtii* contain a light harvesting chlorophyll *a/b* protein of photosystem II (LHCP II). As in other photosynthetic eukaryotes, LHCP II of *Chlamydomonas* is nuclear encoded and cytoplasmically synthesized. Dark grown cells of *Chlamydomonas reinhardtii* JS1000 treated with antibody to LHCP II apoprotein and protein A-gold, do not show deposition of gold particles over plastid thylakoids. When dark-grown cells of *C. reinhardtii* JS1000 are exposed to normal intensities about 8,000 lux of light, the proplastid develops into chloroplast. There are many gold particles over the specific sites in the membrane of proplastid and followed by the thylakoids after these cells exposed to light for 12 hours, as previously shown in the cells of *Euglena* for chloroplast development. However, no deposition of gold particles is observed over the Golgi apparatus in *Chlamydomonas* unlike *Euglena*. Dark-grown cells in the presence of 0.1% streptomycin exposed to light, gold particles are clearly seen over the plastid membranes, but not over the thylakoids of the plastid. Thus conditions allow an unusual accumulation of LHCP II apoprotein and streptomycin blocks the distribution of this apoprotein to the thylakoids.

## 序 論

葉緑体の光化学系タンパク質複合体に代表されるように、オルガネラの機能単位の構造が分子レベルで明らかになってきた。細胞核に支配されるタンパク質分子は細胞質で合成されたのち一定の輸送経路をへて、オルガネラの包膜を通過し内部に転送される。また、そのようなタンパク質分子の多くは細胞質内またはオルガネラの内部でプロセッシングされたのち、最終局在部位へ何らかの方法によって到達し、適切にそこに組み込まれ機能することが知られている<sup>7, 26, 27)</sup>。葉緑体は、葉緑体核遺伝子と細胞核遺伝子とによって合成される種々のタンパク質分子の共同作業によって形成され、機能していることがわかってきた。

現在、細胞核にコードされ細胞質で合成されたそれぞれのタンパク質分子が、ダイナミックな挙動と複雑な構

造をもつ機能単位複合体への組み込み経路について、多くの研究者の関心が集まっている。そして、細胞核支配タンパク質分子の個々の輸送機構については、生化学的、分子生物学的な研究を中心にした多くの研究が世界中で行われている<sup>2, 14, 22-24, 29, 30)</sup>。例えば、高等植物の細胞核にコードされる前駆体タンパク質は、成熟型より大きいタンパク質として細胞質で合成され、一定のプロセッシングを経たのち成熟型へと変化することが知られている<sup>26, 27)</sup>。また、単細胞鞭毛藻 *Euglena gracilis* (ユーグレナ) の光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) は、細胞質で前駆体タンパク質が合成され、前駆体のまま葉緑体内まで輸送される<sup>23)</sup>。ユーグレナでは、細胞質で合成された前駆体タンパク質がどのようにして葉緑体に輸送され、どのように複雑な構造をした葉緑体包膜を通過するのかなどについては現

\* 自然科学 (生命科学専攻), \*\* 運動方法 (水泳), \*\*\* 東京医科大学 (微生物), \*\*\*\* 体育研究所

表1 クロロフィル合成の測定

採取時間 (hr)	細胞濃度 (cells/ml)	測定分の細胞数 (cells)	吸光度 OD <sub>652</sub>	アセトン 1 ml 中の量 ( $\mu$ g/ml)	細胞当たりの量 ( $\mu$ g/cell)
0	$1.1 \times 10^6$	$5.5 \times 10^7$	0.000	0.0	0.0
2	$1.3 \times 10^6$	$6.5 \times 10^7$	0.001	0.03	0.0
4	$1.3 \times 10^6$	$6.5 \times 10^7$	0.005	0.1	$0.2 \times 10^{-8}$
6	$1.1 \times 10^6$	$5.5 \times 10^7$	0.009	0.2	$0.4 \times 10^{-8}$
8	$1.4 \times 10^6$	$7.0 \times 10^7$	0.020	0.6	$0.9 \times 10^{-8}$
10	$1.3 \times 10^6$	$6.5 \times 10^7$	0.031	0.8	$1.0 \times 10^{-8}$
12	$1.4 \times 10^6$	$7.0 \times 10^7$	0.036	1.0	$1.0 \times 10^{-8}$
24	$3.1 \times 10^6$	$15.5 \times 10^7$	0.044	1.2	$0.7 \times 10^{-8}$
48	$4.1 \times 10^6$	$20.5 \times 10^7$	0.055	1.5	$0.7 \times 10^{-8}$

暗所、従属栄養条件下で培養したクラミドモナス JS1000 変異株に照度 8,000 lux の光を照射し、クロロフィルの合成量を経時的に測定した。表は細胞当たりのクロロフィル量を表している。すなわち、暗培養細胞に光を照射した直後の細胞を“0 時間”とすると、クロロフィルの合成は誘導期が 4 時間前後までみられた。その後、12 時間までは緩やかなクロロフィル合成がみられ、以後 24 時間まで急激に増加した。

在不明である。Brandt らは同調培養したユーグレナの LHCP II タンパク質分子を  $^{14}\text{C}$  で標識し、チラコイド膜への輸送経路、ステージを経時的に追跡している<sup>2)</sup>。Osafune らのグループは免疫電子顕微鏡法を用いて、それらを分子細胞形態学的に追究している<sup>16, 20, 22)</sup>。1990 年、Osafune らは暗所で培養したユーグレナに光を照射し、葉緑体が形成する過程で、LHCP II タンパク質分子がゴルジ装置を経由し、葉緑体へ輸送される現象を最初に発見した<sup>14)</sup>。さらに、そのような現象は同調培養したユーグレナの cell cycle 中でも観察されることを明らかにした<sup>16, 20)</sup>。すなわち、分泌タンパク質以外のタンパク質分子がゴルジ装置を通過するという、世界で最初の報告である。1995 年、Schwartzback ら<sup>28, 29)</sup>のグループは、われわれが免疫電子顕微鏡法で見いだした現象 (Osafune *et al.*, 1990)<sup>14)</sup> を全く異なる生化学的手法により裏付けた。

従来から、単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の野生株 (クラミドモナス) は葉緑体の形成過程を詳細に追跡することは不可能であった<sup>21)</sup>。最近、遺伝子 DNA の組換え技術の導入により、クラミドモナスの葉緑体 *chlL* 遺伝子をノックアウトした JS1000 変異株が得られている<sup>30)</sup>。すなわち、葉緑体 *chlL* 遺伝子 DNA の組換えにより、暗環境条件下では光非依存性のプロトクロロフィライドの還元が欠失する。そのためプロトクロロフィライドが蓄積し暗所では葉緑体構造が退化し、黄色化細胞になる<sup>21)</sup>。このような細胞に光を照射すると、プロトクロロフィライドは速やかにクロロフィルに還元され、葉緑体構造が再形成される<sup>21, 30)</sup>。当研究室では、初めて葉緑体の退化と再形成が可能になったクラミドモナ

ス JS1000 変異株を実験系として、オルガネラの構築分子の合成、輸送経路、オルガネラ内部での最終部位への組込や機能の発現が、細胞とオルガネラのどこで、どのように行われているのかなどについて分子細胞形態学的立場から解析しようとしている<sup>21)</sup>。高等植物や真核藻類にみられる光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) は光合成タンパク質の一つで、光を捕捉するアンテナ・タンパク質<sup>19)</sup>である。今回は、最先端技術である免疫電子顕微鏡法を用いて、クラミドモナス JS1000 変異株の葉緑体形成過程で LHCP II 分子がどのように葉緑体へ輸送されるかを追跡した。さらに、ストレプトマイシン処理を行った細胞についても報告する。

## I. 実験方法

### 1. 培養条件、光照射

クラミドモナス JS1000 変異株 (*Chlamydomonas reinhardtii* JS1000) を暗所、有機培地中で温度 26°C、1.5% の  $\text{CO}_2$  を通気し 14~21 日間、振盪培養した。葉緑体が退化した黄色化細胞を無機培地に移し、8,000 lux の蛍光灯 (東芝 30 W) 照射し、直後を 0 時間細胞として経時的に試料の採取を行い実験に供した<sup>21)</sup>。

### 2. Streptomycin sulfate (ストレプトマイシン) 添加実験

黄色化細胞を新鮮培地で 3 日間振盪培養し、最終濃度が 0.1% になるように培地中にストレプトマイシン (和光純薬工業) を添加した<sup>17)</sup>。ストレプトマイシンを添加して 24 時間後に、光を照射し 0 時間細胞として 24, 48 時間後に採取を行い実験に供した。

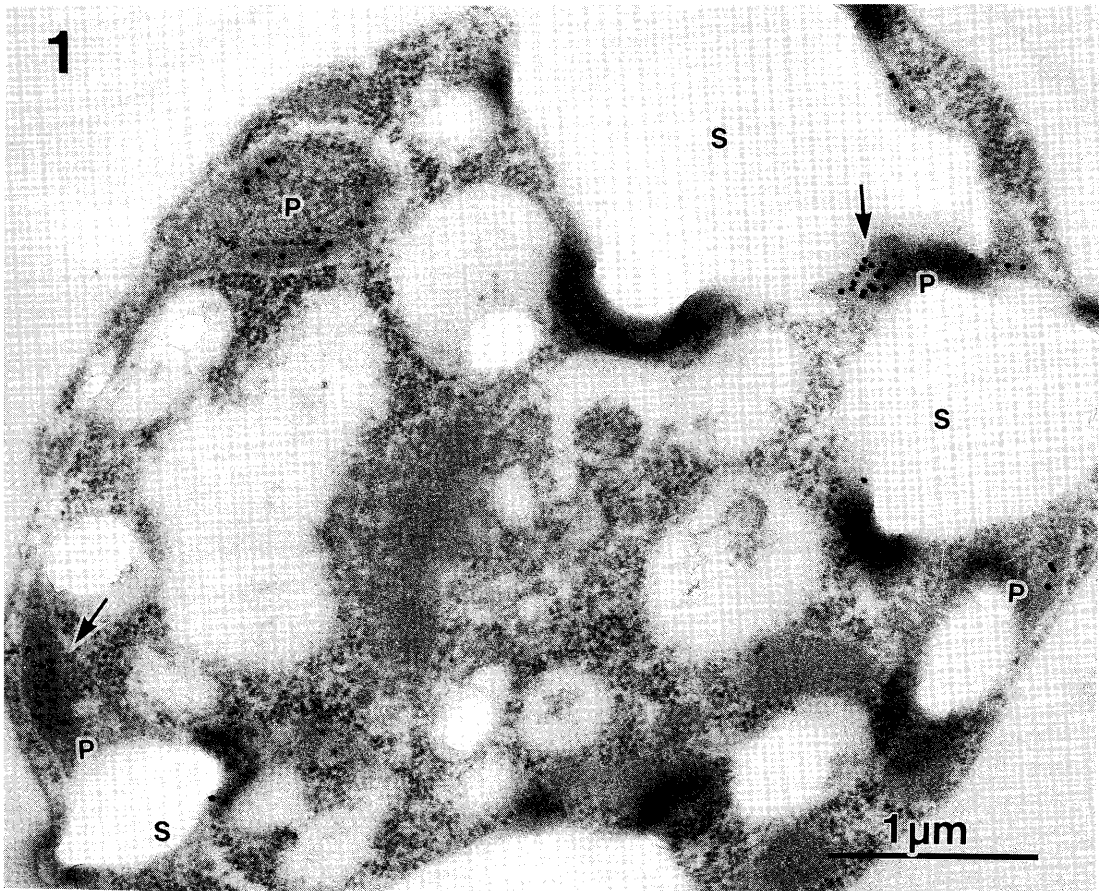


図1 黄色化細胞に光を12時間照射した抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

暗培養したクラミドモナス細胞に 8,000 lux の光を12時間照射し、抗光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) 抗体-免疫電子顕微鏡法によって観察した。ゴールド粒子は LHCP II タンパク質分子の細胞内配置を示す。プラスチドの包膜には電子密度の高い構造がみられ、ゴールド粒子はその部位に特異的に局在している (矢印に示す)。

P: プラスチド, S: デンプン粒子

### 3. 抗 LHCP II 抗体

光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) は単細胞鞭毛藻 *Euglena gracilis* var. *bacillaris* B 株から抽出、精製してウサギから抗 LHCP II 抗体を得た (マサチューセッツ州、ブランダイス大学細胞小器官研究所長 Abraham and Etta Goodman Prof. Jerome A. Schiff から分与された (Cunningham and Schiff, 1986)<sup>9)</sup>。

### 4. クロロフィルの測定

暗培養した細胞を無機培地に移し、光照射直後を0時間細胞とし、試料の経時的採取を行った。クロロフィルの抽出には 80% アセトン溶液を用い、島津 UV-1200

GLP 分光光度計で測定した<sup>4)</sup>。

### 5. 電子顕微鏡試料の固定

採取した細胞培養液中に直接グルタルアルデヒドを最終濃度 1%(v/v) になるように添加し、4℃, 60 分間固定を行った<sup>10~12)</sup>。試料は脱水し、Epoxy 樹脂に包埋した<sup>13)</sup>。

### 6. 免疫電子顕微鏡法

免疫電子顕微鏡法に使用する試料は抗原保持のためにグルタルアルデヒドのみで固定し、Epoxy 樹脂に包埋した。試料は超ミクローム (Reichert) で通常より厚く (100 nm 前後) 超薄切し、ホルムバールまたはコロジオン支持膜を張ったニッケル製グリッド (日新 EM 社) に

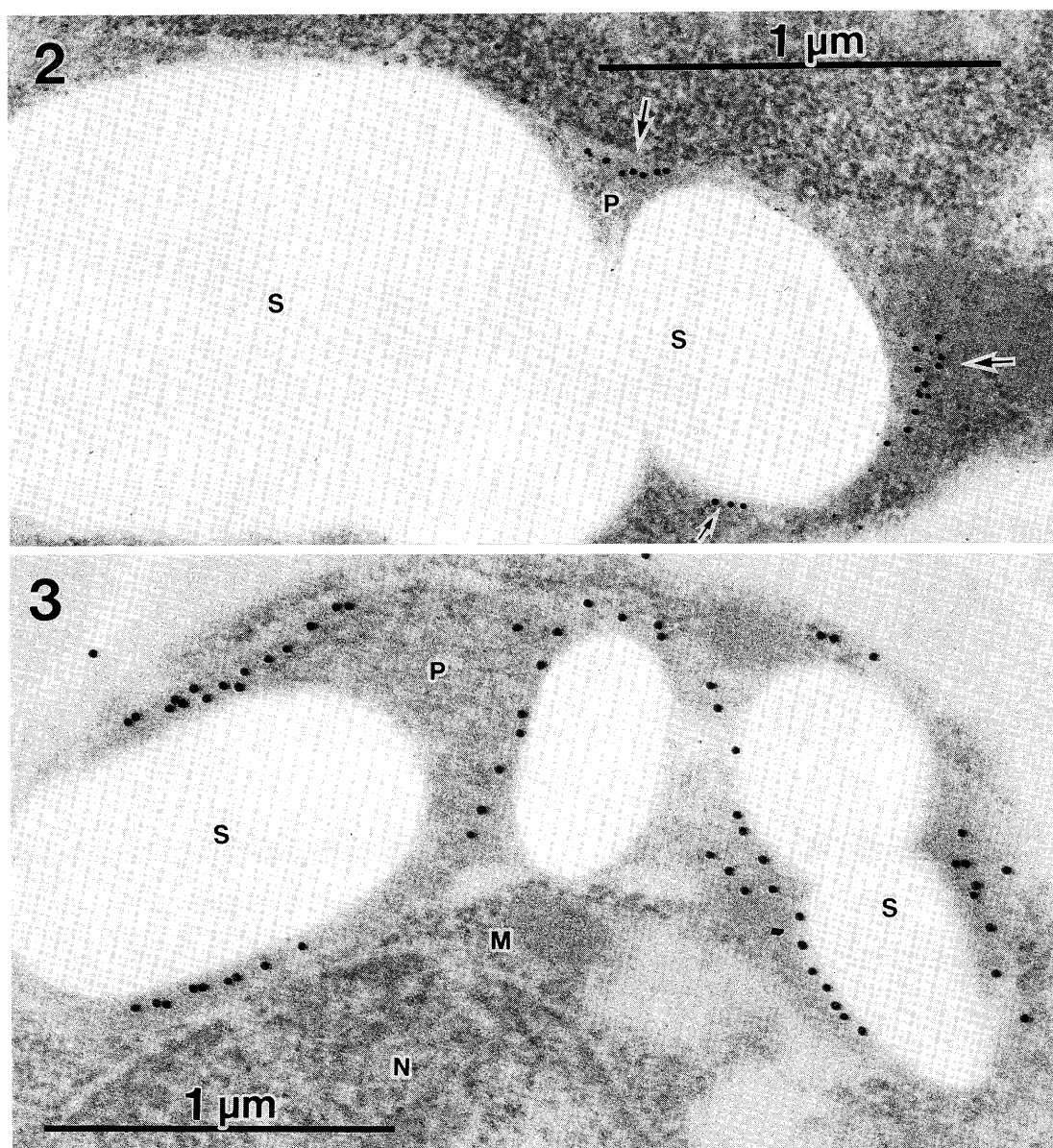


図2 光照射12時間細胞の抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

プラスチド構造を拡大したものである。プラスチド内膜の一部に特異的にゴールド粒子が観察される（矢印に示す）。

P: プラスチド, S: デンプン粒子

図3 光照射14時間細胞の抗 LHCP II 抗体免疫電子顕微鏡像

ゴールド粒子は最初にプラスチド内膜の一部に特異的な局在がみられる。光照射14時間細胞では、LHCP II が内膜に沿って細胞質側の1枚のチラコイド膜に移動する。

M: ミトコンドリア, N: 細胞核

積載した<sup>31)</sup>。次に、目的とする抗原 LHCP II を超薄切片の表面に露出させるため超薄切片を 0.3% 過酸化水素水で 3~10 分間処理し、次に 0.01 M リン酸緩衝食水で 30 分間に 4 回洗浄した。洗浄操作はパラフィルムの上に PBS を水滴状に並べ、グリッドを順次に各々の PBS 中へ移動させて行った。超薄切片を BSA-PBS (PBS に 1% ウシ血清アルブミンを溶解: 半井化学薬品) の中に 30 分間浸漬しブロッキングを行った。抗 LHCP II 抗体を PBS で 400 倍に希釈し、超薄切片上で 37°C, 20 分間反応させた。超薄切片は 0.05% Tween 20 を含む PBS で洗浄した。2 次抗体であるプロテイン A-コロイド金 (EY Lab. Inc., USA) は PBS で 10~20 倍に希釈し、超薄切片上で 20 分間室温で反応させた。次に、0.05% Tween20 を含む PBS で超薄切片を 15 分間洗浄した。電子染色は自動洗浄装置により蒸留水で超薄切片を約 15 分間洗浄し、3% ウラニル酢酸で 10 分間染色処理を行った<sup>15~18)</sup>。

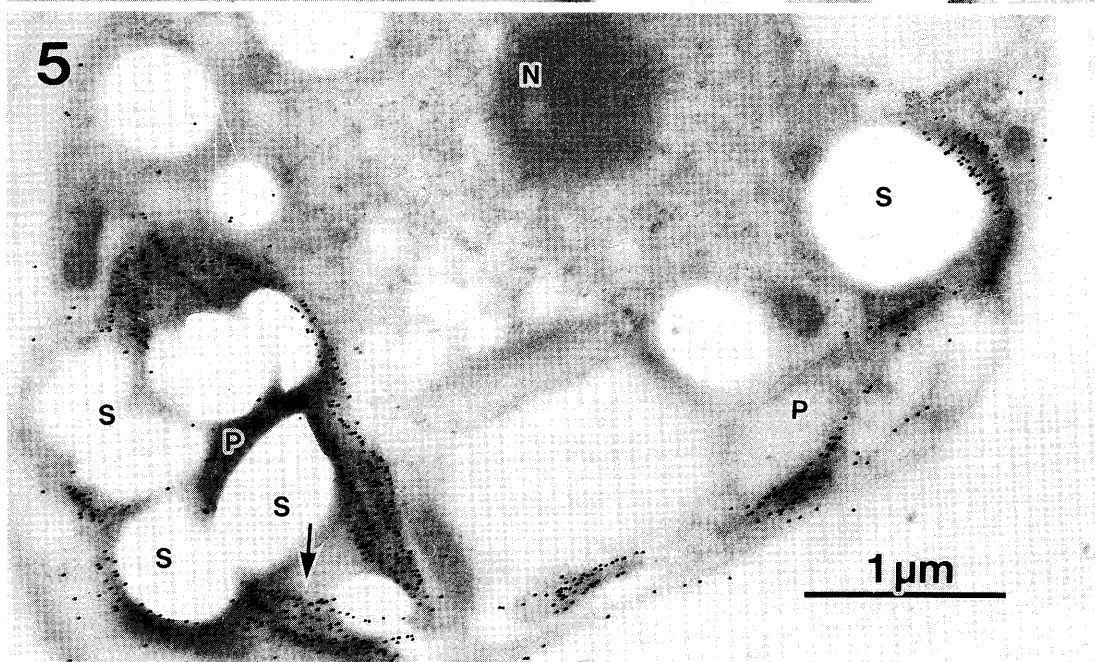
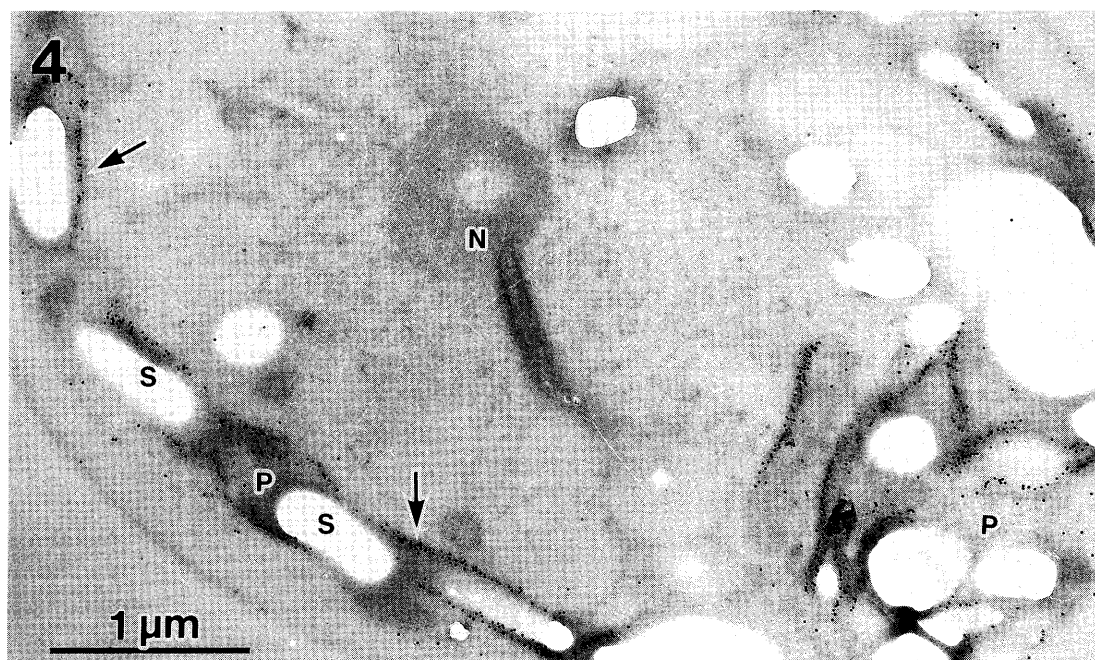
## 7. 電子顕微鏡観察

試料は健志台キャンパス電子顕微鏡室の大型電子顕微鏡 JEOL-100CX 型 (日本電子 KK) により、加速電圧 80 kV で観察した<sup>20)</sup>。

## II. 実験結果

単細胞緑藻クラミドモナス変異株 (*Chlamydomonas reinhardtii* JS1000) は、葉緑体遺伝子 DNA 組換によって、葉緑体の可逆的な退化と再形成が観察される<sup>21)</sup>。すなわち、暗中では光非依存性のプロトクロフィルの還元が欠失するため、葉緑体内にはプロトクロフィルが蓄積し、未発達の葉緑体であるプロプラスチドと呼ばれる構造が形成される<sup>21, 30)</sup>。このような黄色化細胞に光を照射すると、蓄積されたプロトクロフィルは還元され、クロフィルの合成とともにプロプラスチドの発達過程が進行し 48 時間で葉緑体構造が完成する<sup>21)</sup>。表 1 は光照射直後の細胞を 0 時間として、細胞数とクロフィル量の経時的変化を示している。細胞増殖はおおよそ 12 時間まで誘導期がみられ、細胞数は 48 時間で 4 倍になる (表 1)。クロフィル量は 4 時間まで誘導期が観察され、24 時間から急激な増加が見られることがわかる (表 1)。このような結果は、免疫電子顕微鏡法による光化学系 II・集光性クロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) の観察とほぼ一致している<sup>3)</sup>。すなわち、LHCP II は免疫電子顕微鏡法によって、クロフィル合成の始まる 12 時間前後から観察されるようになることとよく一致する (図 1)。図 1 は 12 時間細胞の抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像である。コロイド金粒

子は LHCP II タンパク質分子の配置を示している。図 1 の矢印は葉緑体包膜の一部に沿ってみられる電子密度の高い領域で、コロイド金粒子が集積している。また、葉緑体内部には著しい量のデンプン粒子が観察される (図 1, 2)。図 2 は同じステージの細胞における拡大写真を示している。コロイド金粒子は、葉緑体包膜の特定の場所に特異的に配置されているのが観察される (図 2 矢印)。図 3 は 14 時間細胞の免疫電子顕微鏡像である。コロイド金粒子は葉緑体包膜の内側に沿って移動しているのがわかる (図 3)。すなわち、LHCP II タンパク質分子は最初に葉緑体包膜の数箇所にある site を通過し、その部位から包膜内側に沿って外側にあるチラコイド膜に運ばれていることが明らかになった。図 4, 5 は 24 時間細胞の免疫電子顕微鏡像である。チラコイド膜面に沿って全体にコロイド金粒子が集積しているのがわかる (図 4 矢印)。図 5 は拡大像である。矢印はコロイド金粒子が複数のチラコイド膜上に局在していることを示す。LHCP II タンパク質分子は外側にあるチラコイド膜から順次に内部の膜へ組込まれる。図 6 は 48 時間細胞をグルタルアルデヒド、オスミック酸固定液で処理し得られた電子顕微鏡像である。光照射 48 時間の後、完全な光合成能を有するチラコイド膜が形成される。チラコイド膜は相互に stacking (スタッキング) しているのがわかる。矢印はピレノイド構造を貫通するチラコイド膜を示す。すなわち、ストロマにあるチラコイド膜とピレノイドの膜は 1 枚で連結していることがわかる (図 6 矢印)。図 7 は 48 時間細胞の抗 LHCP II 抗体処理-免疫電子顕微鏡像である。LHCP II タンパク質分子はすべてのチラコイド膜に局在している。一方、ピレノイド構造内部にあるチラコイド膜 (T) にコロイド金粒子の局在は全くみられない (図 7)。図 7 の矢印はストロマ側にあるチラコイド膜を示し、コロイド金粒子が観察される。したがって、チラコイド膜は LHCP II タンパク質分子の局在性から、ストロマ領域とピレノイド構造内部とは性質が異なると思われる。図 8 はストレプトマイシン処理した後、24 時間の光照射した細胞の免疫電子顕微鏡像である。コロイド金粒子はストロマ内部に輸送され、包膜周辺部に留まっているのがわかる。新しく形成されたラメラ構造を有するチラコイド膜 (図 8 の矢印に示す) へのコロイド金粒子の局在はみられない。すなわち、LHCP II タンパク質分子のオルガネラ内部における適切な転送、最終局在部位への組込が、70S タイブリボソーム上で合成されるタンパク質によって行われていることを示唆する。





### III. 考 察

単細胞緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* (クラミドモナス) は培養条件の変化によって葉緑体の退化や再形成が起こらない代表的な藻類の一つである<sup>1, 9, 21)</sup>。すなわち、クラミドモナスは単細胞藻類ユーグレナやクロレラとは性質が異なり、細胞は暗環境でも、光環境条件下でもプロトクロロフィライドが速やかにクロロフィルに還元される。本研究に用いたクラミドモナス JS1000 変異株は、遺伝子 DNA の組換え技術により、葉緑体の chlL 遺伝子をノックアウトして得られたものである<sup>30)</sup>。その結果、細胞は暗環境条件下では光非依存性のプロトクロロフィライドの還元が欠失するため、プロトクロロフィライドを蓄積して同時に葉緑体構造の崩壊がおこる<sup>21, 30)</sup>。このような細胞に光を照射すると、プロトクロロフィライドは速やかにクロロフィルに還元され、葉緑体の再形成が起こる<sup>21, 30)</sup>。

本報告は、クラミドモナスの葉緑体再形成過程における光合成タンパク質の動態を、最初に免疫電子顕微鏡法により追究したものである。現在、葉緑体の光化学系タンパク質に代表されるように、光合成の機能単位の構造が分子レベルで明らかになるにつれて、それらの分子のダイナミックな輸送に関心が集まってきている<sup>22, 24, 29, 30)</sup>。光合成タンパク質のなかで、最も大量に存在するチラコイド膜の光化学系 II・集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質複合体 (LHCP II) は太陽エネルギーを補足する親脂性の高いタンパク質として知られている。この通過ペプチドを切り除くと、プロテアーゼ活性はストロマ画分に検出される金属プロテアーゼであることがわかる。そのため親水性の高いペプチドが、この前駆体タンパク質の細胞質とストロマ中での移動を容易にし、プロセッシングによって通過ペプチドを失うと、その親水性によってチラコイド膜への結合が容易になると考えられている。LHCP II タンパク質分子は、細胞核にコードされ細胞質で合成されたのち、何らかの方法によって葉緑体に輸送され、最終的な局在場所にたどり着くことが判っている (Schmidt and Mishkin, 1986)<sup>27)</sup>。オルガネラの内部では、タンパク質分子はプロセッシン

グを受け、最終的な局在場所であるチラコイドに到達し、その膜に組込まれることが知られている<sup>27)</sup>。しかし、タンパク質分子がどのようにして複雑な構造をもった光合成装置に組込まれ、機能を発揮できるようになるのか。また、光合成反応をつかさどるタンパク質分子は何時、どのようにして膜などに組込まれているのか。現在のところ、あまり多くの知見はない。1990 年、Osafune らのグループは単細胞鞭毛藻ユーグレナ細胞の LHCP II タンパク質分子の動態を免疫電子顕微鏡法により追跡し、ゴルジ装置を経由し葉緑体へ輸送されることを発見している<sup>14)</sup>。

図 1~7 はクラミドモナス JS1000 変異株の葉緑体形成過程における LHCP II タンパク質分子の動態を、免疫電子顕微鏡法で追跡したものである。表 1 に示すように、光照射によってクロロフィル合成は 12 時間前後から急激に始まり、同時に LHCP II 合成も起こる。図 1 の矢印はプラスチドに特異的に集積したコロイド金粒子を示している。すなわち、LHCP II タンパク質分子は最初にプラスチドに観察される。クラミドモナスではユーグレナ細胞と異なり、LHCP II タンパク質分子のゴルジ装置への局在はみられなかった<sup>14, 16, 17, 28)</sup>。この結果は、おそらくクラミドモナスの LHCP II タンパク質分子はユーグレナと比べ前駆体の分子量が小さいためと思われる。ユーグレナでは、細胞質で合成される前駆体は巨大分子で 210 kDa 前後のことが知られている<sup>28)</sup>。図 2 はプロプラスチド包膜の特異的な個所に集積する LHCP II タンパク質分子を示す。すなわち、葉緑体包膜には LHCP II タンパク質分子が特異的に通過する場所が複数個存在する<sup>17, 22)</sup>。タンパク質分子は、このような binding site を経由して、細胞質からオルガネラに輸送されていることがわかる (図 2 矢印)。LHCP II はこのような部位を通過したのち葉緑体の包膜内面に沿ってストロマ内に送られることが明らかになった (図 3)。図 4, 5 は 24 時間細胞である。この像から、最初に葉緑体包膜内側へ配置された LHCP II タンパク質分子は、ストロマ内部に形成されたのち、チラコイド膜へ順次移動していることがわかる。すなわち、図 5 の矢印に示す

図 4 光照射 24 時間細胞の抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

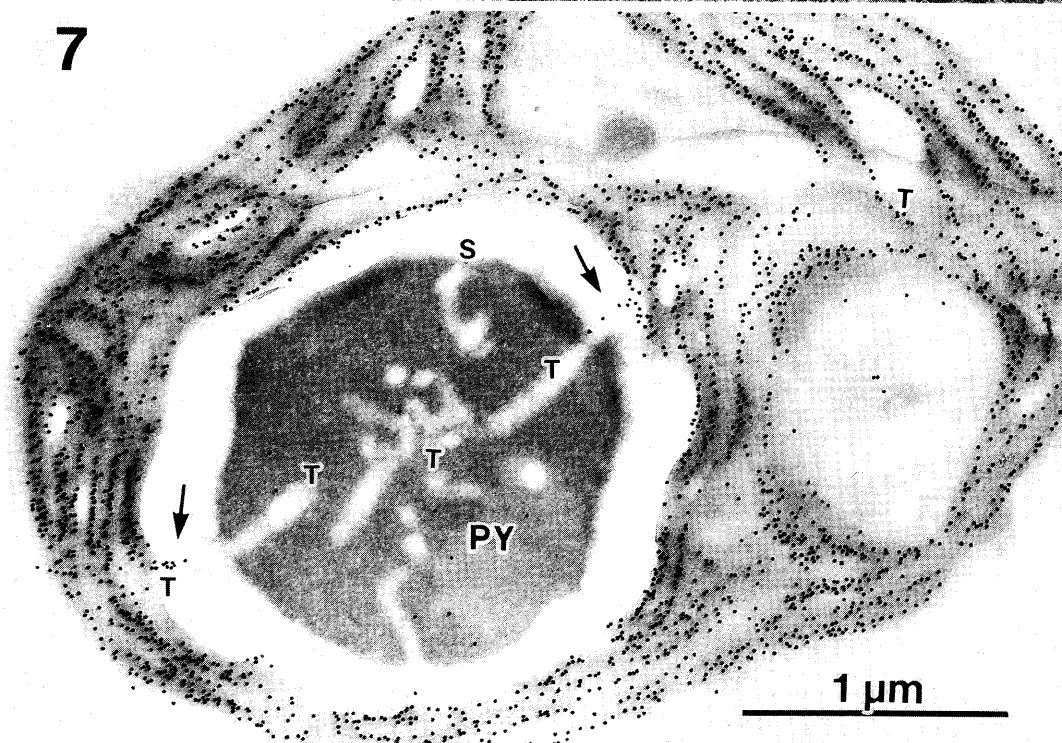
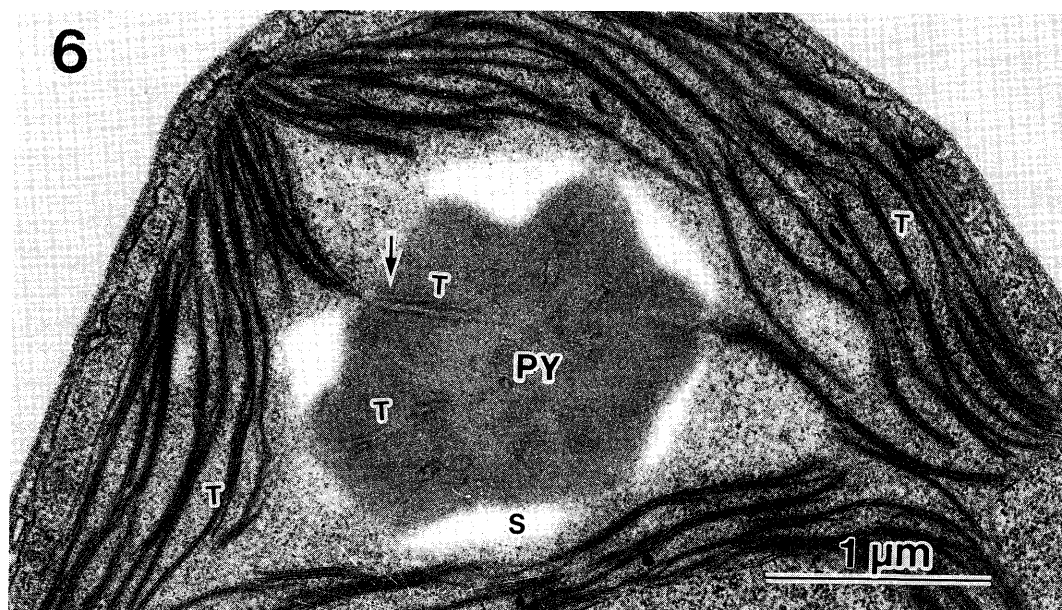
LHCP II はプラスチドの内膜に沿って細胞質側からのチラコイド膜全体に移動している。ゴールド粒子はチラコイド膜の外側から内側に局在しているのがわかる (矢印に示す)。

M: ミトコンドリア, N: 細胞核, P: プラスチド, S: デンプン粒子

図 5 光照射 24 時間細胞の抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

ゴールド粒子が内部のチラコイド膜に局在する (矢印)。すなわち、LHCP II は細胞膜側のチラコイド膜から、ストロマ側へ移動することを示唆している。

N: 細胞核, P: プラスチド, S: デンプン粒子





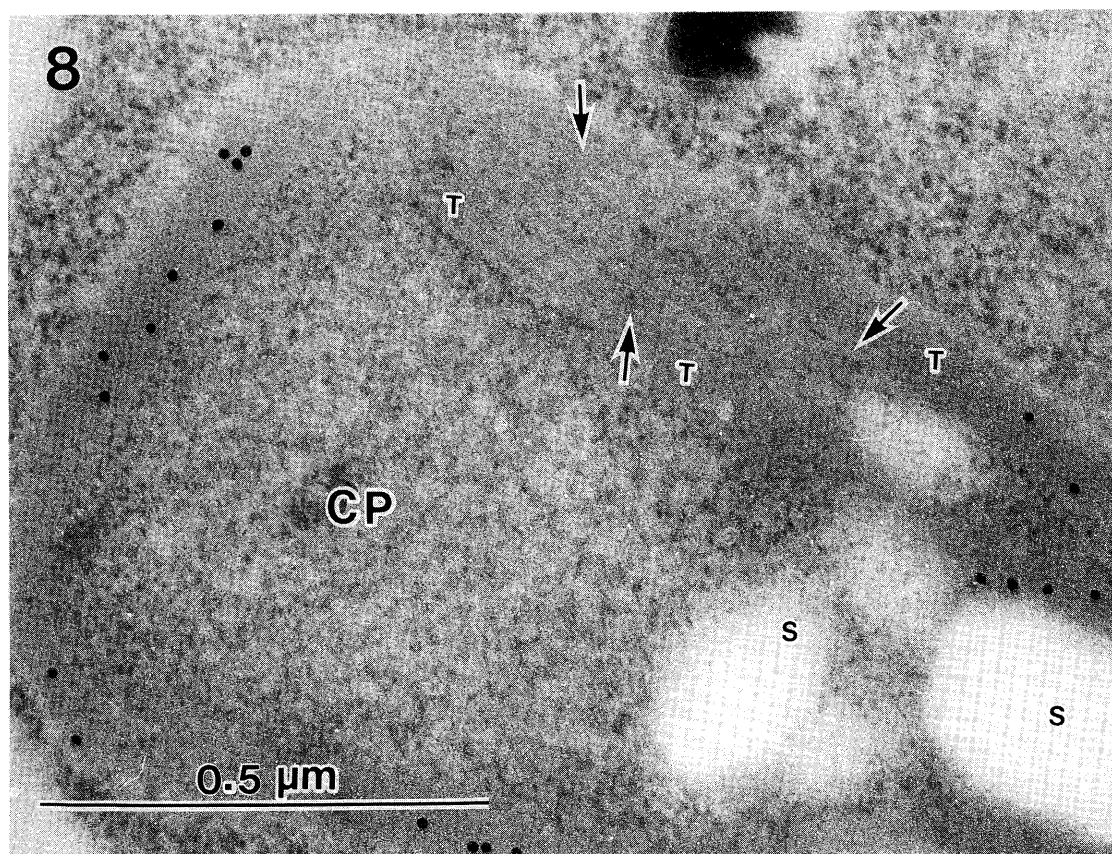


図8 黄色化細胞をストレプトマイシンで処理後した抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

暗培養細胞液中に最終濃度が 1% になるようにストレプトマイシンを添加し、光照射 48 時間後の葉緑体 (CP) 切片像である。ゴールド粒子の局在性は stacking したチラコイド膜 (T: 矢印) には見られない。ストレプトマイシン処理細胞では、LHCP II はプラスチド包膜にある binding site と思われる部位を通過し、その周辺に留まっていることがわかる。すなわち、LHCP II は細胞質で合成されたのちプラスチド内部に輸送される。それが最終局在部位へ転送され組込まれるためには、プラスチド遺伝子 DNA にコードされ、ストロマで合成されるタンパク質の介添えが必要と思われる。

CP: 葉緑体, S: デンプン粒子, T: チラコイド膜

図6 光照射 48 時間細胞の電子顕微鏡超薄切片像

細胞はグルタルアルデヒドで処理したのち、2%オスミック酸固定液 (50 mM リン酸緩衝液, pH 7.4) で後固定を行った。光照射開始 48 時間後、チラコイド膜は相互にスタッキングし、ラメラ構造を形成する。すなわち、48 時間後には光合成能をもつ葉緑体構造が完成する。矢印はピレノイドチラコイド膜を示す。

PY: ピレノイド, S: デンプン粒子, T: チラコイド膜

図7 光照射 48 時間細胞の抗 LHCP II 抗体-免疫電子顕微鏡像

図6にみられるように、葉緑体チラコイド膜が再形成される。ゴールド粒子はすべてのチラコイド膜上に特異的に局在している。すなわち、LHCP II タンパク質分子は細胞質で合成されたのち、葉緑体の最終局在部位であるチラコイド膜内部に組込まれる。矢印は、LHCP II がストロマチラコイド膜に局在することを示している。一方、LHCP II の局在性は、ピレノイドチラコイド膜 (T) には全くみられないことが本研究で明らかになった。

PY: ピレノイド, S: デンプン粒子, T: チラコイド膜

ように、コロイド金粒子がストロマの内部へ集積している。図6は完成した葉緑体のチラコイド膜に局在する LHCP II タンパク質分子である。ストロマ領域のすべてのチラコイド膜には、LHCP II の配置を示すゴールド粒子が観察される。一方、ピレノイド内部を貫通するチラコイド膜への局在はみられなかった。したがって、免疫電子顕微鏡法による LHCP II タンパク質分子の細胞内配置から、葉緑体内部には少なくとも性質の異なる2種類のチラコイド膜が存在していると思われる。今後、これらのチラコイド膜の性状分析が、ピレノイド構造とチラコイド膜形成との相関性の解明に、重要な意義をもつものと考えられる。

次に、クラミドモナスの LHCP II タンパク質分子が binding site を通過したのち、葉緑体内部に輸送され、どのようにして最終局在部位のチラコイド膜に組込まれるのか。これらの問題を解決する手始めとして、オルガネラのタンパク質合成を阻害するストレプトマイシンの添加実験<sup>17)</sup>を行った。ストレプトマイシンは真菌 *Streptomyces griseus* などによって産生される抗生物質である<sup>19)</sup>。原核生物が有する 70S タイプリボソームの 30S サブユニットに結合し、タンパク質合成を阻害することが知られている<sup>19)</sup>。図8は培地中にストレプトマイシンを添加し培養した細胞の光照射 24 時間後の免疫電子顕微鏡像である。ゴールド粒子の局在はラメラ構造をもつ完成したチラコイド膜 (T) 上にはみられない。すなわち、LHCP II タンパク質分子は細胞質から葉緑体内部に輸送されるが、包膜周辺部に留まってチラコイド膜への転送はされないことがわかる (図8)。この結果から、ストロマ内部の LHCP II タンパク質分子がチラコイド膜に転送されるためには、オルガネラ内部で合成されたタンパク質の介添えが必要である。現在、葉緑体だけでなくミトコンドリアにおいても、タンパク質の高次構造形成の分子的な介添え役をする、シャペロニンと呼ばれるタンパク質が報告されている (Hemmingsen *et al.*, 1988)<sup>5)</sup>。真核細胞には内膜が発達しているために、細胞質で合成されたタンパク質分子は内膜を通過してオルガネラに輸送される。ところが、膜の主成分は脂質なので分子の表面に親水性基をもつタンパク質分子は通過できない。したがって、シャペロニンの介添えが必要になる<sup>5)</sup>。例えば、LHCP II タンパク質などを通過ペプチドとのキメラタンパク質にして葉緑体に取込ませると、葉緑体の内部でシャペロニンと結合することが知られている<sup>32)</sup>。このように、シャペロニンは葉緑体内でタンパク質の高次構造形成に関与していることが示唆される。したがって、クラミドモナスの葉緑体内部でもシャペロニ

ン様タンパク質が LHCP II のオルガネラ内部での転送、組込に関与していると考えられる。シャペロニンは *Escherichia coli* では高温ストレスタンパク質の一つであり、DNA 複製や mRNA の安定性にも関与していることが明らかにされている<sup>5, 6, 8)</sup>。このようにシャペロニンはタンパク質の高次構造の形成に際し、ポリペプチドの不正な折り畳みを防ぐように機能していると考えられるようになった<sup>8, 32)</sup>。しかし、この働きに必要な反応機構にはまだ不明な点が多い。今後、クラミドモナスの葉緑体内部における LHCP II タンパク質分子の転送や組込の解明には、ストレプトマイシン添加実験で推測されたシャペロニン様タンパク質の分離、精製が必要になると思われる。それらによって、当タンパク質を中心とした光合成装置の分化機構と、その相関性などが明らかにされてくるであろう。

## 謝 辞

本研究の一部は平成9年度文部省科学研究費・基盤研究 (C) 第09640795号、平成7年度文部省科学研究費基盤研究 (C) 第07640886号、総合研究 (A) 第07304082号、日本体育大学・特別教育研究費および日本私学振興財団・学術研究振興資金の補助によって行われた。

## 文 献

- 1) Bogorad, L.: Factors associated with the synthesis of chlorophyll in the dark in seedlings of *Pinus jeffreyi*. *Bot. Gaz.*, **3**, 221-241 (1950).
- 2) Brandt, P. and von Kessel, B.: Cooperation of cytoplasmic and plastidial translation in formation of the photosynthetic apparatus and its stage-specific efficiency. *Plant Physiol.*, **72**, 616-619 (1983).
- 3) Cunningham, Jr., F. X. and Schiff, J. A.: Chlorophyll-protein complexes from *Euglena gracilis* and mutants deficient in chlorophyll *b* II. Polypeptide composition. *Plant Physiol.*, **80**, 231-238 (1986).
- 4) Ehara, T., Shihira, I., Osafune, T. and Hase, E.: Some structural characteristics of chloroplast degeneration in cells of *Euglena gracilis* Z during their heterotrophic growth in darkness. *J. Electron Microscopy*, **24**, 253-261 (1975).
- 5) Hemmingsen, S. M. *et al.*: Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature*, **333**, 330-334 (1988).
- 6) 石川 統: シャペロニンとオルガネラ. Annual Review 細胞生物学, 中外医学社, pp. 74-85

- (1993).
- 7) Keegstra, K. and Olsen, L. J.: Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **40**, 471-501 (1989).
- 8) Morimoto, R. I., Tissieres, A. and Georgopoulos, C.: The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, New York (1994).
- 9) Ohad, I., Siekevitz, P. and Palade, G. E.: Biogenesis of chloroplast membranes. I. Plastid dedifferentiation in a dark-grown algal mutant (*Chlamydomonas reinhardtii*). *J. Cell Biology*, **35**, 521-552 (1967).
- 10) Osafune, T.: Three-dimensional structures of giant mitochondria, dictyosomes and "concentric lamellar bodies" formed during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. *J. Electron Microscopy*, **22**, 51-61 (1973).
- 11) Osafune, T. and Hase, E.: Some structural characteristics of the chloroplasts in the "glucose bleaching" and re-greening cells of *Chlorella protothecoides*. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **168**, 533-542 (1975).
- 12) Osafune, T.: Studies of three-dimensional structures of mitochondria during the cell cycle of *Euglena gracilis* Z in synchronous culture. *J. Tokyo Med. Coll.*, **35**, 873-879 (1977).
- 13) Osafune, T. and Ehara, T.: Studies of three-dimensional structures of mitochondria during the cell cycle of *Chlamydomonas reinhardtii* Dangeard in synchronous culture I. Membrane fusion in mitochondria. *J. Tokyo Med. Coll.*, **37**, 113-119 (1979).
- 14) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Immunogold localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of *Euglena*. *Cell Struct. Funct.*, **15**, 199-205 (1990).
- 15) Osafune, T.: Three-dimensional distribution of LHCP II apoprotein immunoreaction in synchronous cells of *Euglena*. *Plant Morphology*, **3**, 49-55 (1991).
- 16) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent localization of LHCP II apoprotein in the Golgi of synchronized cells of *Euglena gracilis* by immunogold electron microscopy. *Exp. Cell Res.*, **193**, 320-330 (1991).
- 17) Osafune, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Accumulation of LHCP II apoprotein immunoreaction in wax-rich cells of *Euglena* in low light or in the presence of streptomycin. *J. Structural Biol.*, **109**, 97-108 (1992).
- 18) Osafune, T., Ehara, T., Schiff, J. A. and Hase, E.: Stage-dependent association of nuclear and chloroplast DNA molecules through bridges transiently formed between the two organelles in synchronized cells of *Euglena gracilis*. *J. Electron Microscopy*, **42**, 197-201 (1993).
- 19) 長船哲齊 (分担執筆): 岩波生物学辞典, 第4版 (編集: 八杉龍一), 岩波書店 (1996).
- 20) Osafune, T.: Immunoelectron microscopic studies on the behavior of LHCP II in *Euglena*. *Plant Morphology*, **8**, 45-59 (1996).
- 21) 長船哲齊, 江原友子, 小早川ゆり, 浜田元輔, 清原伸彦, 大和 眞: ChlL 遺伝子 DNA 組換えクラミドモナスの葉緑体形成過程 1. 電子顕微鏡によるプラスチド構造の観察. 日体大紀要, **27**, 151-164 (1997).
- 22) Osafune, T. and Schwartzbach, S.: Cell and molecular biology of chloroplast polypeptide precursors of *Euglena*. *International Review of Cytology* (ed. by Kwang W. Jeon), Academic Press, New York, Boston, London (1997), in press.
- 23) Rikin, A. and Schwartzbach, S. D.: Extremely large and slowly processed precursors to the *Euglena* light harvesting chlorophyll *a/b* binding proteins of photosystem II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5117-5121 (1988).
- 24) Rikin, A. and Schwartzbach, S. D.: Regulation by light and ethanol of the synthesis of the light harvesting chlorophyll *a/b* binding protein of photosystem II in *Euglena*. *Planta*, **178**, 76-83 (1989).
- 25) Schiff, J. A., Schwartzbach, S. D., Osafune, T. and Hase, E.: Photocontrol and processing of LHCP II apoprotein in *Euglena*: Possible role of Golgi and other cytoplasmic sites. *J. Photochem. Photobiol.*, **11**, 219-236 (1991).
- 26) Schmidt, G. W. et al.: The transport of proteins into chloroplasts. *J. Cell Biol.*, **91**, 468-478 (1982).
- 27) Schmidt, G. W. and Mishkind, M. L.: The transport of proteins into chloroplasts. *Ann. Rev. Biochem.*, **55**, 879-912 (1986).
- 28) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: The polypeptide precursor to the *Euglena* light harvesting chlorophyll *alb*-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polypeptide processing. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13084-13090 (1995).
- 29) Sulli, C. and Schwartzbach, S.: A soluble protein is imported into *Euglena* chloroplasts as a membrane-bound precursor. *The Plant Cell*, **8**, 45-53 (1996).
- 30) Suzuki, J. Y. and Bauer, C. E.: Light-inde-

- pendent chlorophyll biosynthesis: Involvement of the chloroplast gene chlL (frxC). *Plant Cell*, **4**, 929-940 (1992).
- 31) 津山 薫, 北山雅彦, 北山 薫, Togasaki, R., 小早川ゆり, 浜田元輔, 清原伸彦, 長松哲齊, 大和眞: *Chlamydomonas* の運動性と活性酸素消去酵素(Fe-SOD)との相関性. 日本体育大学体育研究所雑誌, **22**, 15-24 (1997).
- 32) 渡辺 昭: チラコイド膜タンパク質の輸送と分子集合—細胞核支配タンパク質を中心にして—, 植物細胞工学, **2**, 219-227 (1990).